

(19) RÉPUBLIQUE FRANÇAISE  
INSTITUT NATIONAL  
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE  
PARIS

(11) N° de publication : **2 642 086**  
à n'utiliser que pour les  
commandes de reproduction

(21) N° d'enregistrement national : **89 00973**

(51) Int Cl<sup>5</sup> : C 12 N 15/12, 15/70, 15/79; A 61 K 37/02.

(12) **DEMANDE DE BREVET D'INVENTION**

A1

(22) Date de dépôt : 26 janvier 1989.

(30) Priorité :

(43) Date de la mise à disposition du public de la  
demande : BOPi « Brevets » n° 30 du 27 juillet 1990.

(60) Références à d'autres documents nationaux appa-  
rentés :

(71) Demandeur(s) : *SANOFI, Société anonyme. — FR.*

(72) Inventeur(s) : Daniel Caput ; Pascual Ferrara ; Mourad  
Kaghad.

(73) Titulaire(s) :

(74) Mandataire(s) : Cabinet Beau de Loménie.

(54) Gène recombinant codant pour un facteur basique de croissance des fibroblastes et ledit facteur.

(57) L'invention concerne un gène recombinant comportant  
une séquence d'ADN codant pour un facteur basique de  
croissance des fibroblastes.

Ce gène code pour une protéine dont la séquence com-  
prend une première sous-séquence :

X AlaAlaGlySer

IleThrThrLeuProAlaLeuProGluAspGlyGlySerGlyAlaPheProProGlyHis  
PheLysAspProLysArgLeuTyrCysLysAsnGlyGlyPhePheLeuArgIleHisPro  
AspGlyArgValAspGlyValArgGluLysSerAspProHisIleLysLeuGlnLeuGln  
AlaGluGluArgGlyValValSerIleLysGlyValCysAlaAsnArgTyrLeuAlaMet  
LysGluAspGlyArgLeuLeuAlaSerLysCysValThrAspGluCysPhePheGlu  
ArgLeuGluSerAsnAsnTyrAsnThrTyrArgSerArgLysTyrThrSerTrpTyrVal  
AlaLeuLysArgThrGlyGlnTyrLysLeuGlySerLysThrGlyProGlyGlnLysAla  
IleLeuPheLeuProMetSerAlaLysSer

dans laquelle X représente l'un quelconque des vingt acides  
aminés du code génétique.

en amont de cette sous-séquence une deuxième sous-sé-  
quence constituée de l'ensemble ou d'une partie tronquée

dans sa partie amont et comportant plus de deux acides  
aminés de la suite :

LeuGlyAspArgGlyArgGlyArgAlaLeuProGlyGlyArgLeuGlyGlyArgGlyArg  
GlyArgAlaProGluArgValGlyGlyArgGlyArgGlyArgGlyThrAlaAlaProArg  
AlaAlaProAlaAlaArgGlySerArgProGlyProAlaGlyThr

et en amont de cette deuxième sous-séquence éventuellement  
une méthionine.

FR 2 642 086 - A1

D

Gène recombinant codant pour un facteur basique de croissance des fibroblastes et ledit facteur.

05 La présente invention concerne un nouveau gène recombinant comportant une séquence d'ADN codant pour un facteur basique de croissance des fibroblastes, un vecteur d'expression portant ce gène, des cellules eucaryotes et des microorganismes procaryotes contenant ce vecteur, un nouveau facteur basique de croissance des fibroblastes d'origine humaine obtenu à l'aide de ce gène ainsi qu'un nouveau médicament contenant ce facteur.

10 Le facteur basique de croissance des fibroblastes (ci-après parfois abrégé (bFGF) est un puissant mitogène qui stimule la croissance de nombreux types de cellules dérivées du mésoderme et du neuroectoderme, en particulier celle des cellules endothéliales provenant soit de vaisseaux importants soit de capil-  
15 laires. (D. Gospodarovicz et al. (1986), 46, 187-204). Son activité angiogénique en fait une protéine intéressante en tant que principe actif de médicaments, en particulier ceux destinés à stimuler la régénération des tissus endommagés à la suite de blessures ou de brûlures. (J.M. DAVIDSON et al., J.C.B. (1985), 100, 1219-1227). Ce  
20 facteur présente probablement également un intérêt dans le traitement de l'infarctus du myocarde (Cf. les brevets américains 4 296 100 et 4 378 347) et dans celui des désordres neurologiques dégénératifs tels que la maladie de Parkinson ou d'Alzheimer (P. WALICKE et al. (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.), 83,  
25 3012-3016).

Pour ces applications, il paraît souhaitable de disposer d'une quantité importante de facteur basique de croissance des fibroblastes d'origine humaine (ci-après parfois abrégé hbFGF).

30 Celui-ci est présent dans de nombreuses sortes de cellules humaines, notamment celles d'organes tels que le cerveau, l'hypophyse, l'hypothalamus, les reins, les glandes surrénales, le thymus, la prostate, de phagocytes tels que les macrophages, de tissus tels que le placenta et le cartilage et de tissus malins tels les chondrosarcomes, les mélanomes et les hépatomes. Ce  
35 facteur est - semble-t-il d'après les caractérisations effectuées après isolement de ce dernier à partir de diverses sources - une

protéine existant sous plusieurs formes d'activité biologique semblable, qui présentent la même séquence du côté carboxyterminal mais différent par leur nombre total d'acides aminés. Des formes de 146, 154 et 157 acides aminés ont ainsi été isolées à partir  
05 respectivement du cerveau, de la prostate et du placenta. (D. Gospodarowicz et al. (1986) Mol. Cell. Endocrinal 46, 187-204 et D. MOSCATELLI (1988) Biochimie, 70, 83-87).

Devant les quantités insuffisantes de facteur basique de croissance des fibroblastes isolées à partir de cellules humaines  
10 et les risques de contamination, notamment par les virus du sida ou de l'hépatite, il existe un besoin pour des outils et des techniques de génie génétique permettant de s'affranchir de ces inconvénients. Certains de ceux-là sont déjà connus : des plasmides recombinants codant pour les formes de 146 et 154 acides aminés ont  
15 ainsi déjà été exprimés dans Escherichia coli et dans d'autres cellules animales (Cf., en particulier, les demandes de brevet EP-A0237966 et WO-87 01728).

La demanderesse a construit une bibliothèque d'ADNc à partir des ARN messagers de la lignée cellulaire d'hépatome  
20 SK-HEP1, de laquelle elle a isolé, à l'aide de sondes nucléotidiques construites sur la base des séquences du hbFGF déjà connues, puis séquencé un ADNc codant pour le hbFGF. Par mutagenèse et utilisation de plasmides recombinants, elle a mis en évidence in vitro et in vivo l'existence de hbFGF comportant plus de 157 acides  
25 aminés. Cette mise en évidence n'aurait pas été réalisable sur la base des deux autres séquences non strictement identiques déjà publiées de l'ADNc du hbFGF (J. ABRAHAM et al. (1986) EMBO J., 5, 2523-2528 et T. KUROKAWA et al. (1987) Febs, 213, 1., 189-194). Cette mise en évidence a permis de construire un nouveau gène  
30 recombinant codant pour un nouveau facteur basique de croissance des fibroblastes d'origine humaine hbFGF de séquence plus longue dans sa partie amino terminale que celles des hbFGF déjà connues et présentant une activité biologique intéressante.

L'invention concerne donc un gène recombinant comportant  
35 une séquences d'ADN codant pour un facteur basique de croissance des fibroblastes, caractérisé en ce que celle-ci code pour une

protéine dont la séquence comprend une première sous-séquence :

X AlaAlaGlySer

05 IleThrThrLeuProAlaLeuProGluAspGlyGlySerGlyAlaPheProProGlyHis  
 PheLysAspProLysArgLeuTyrCysLysAsnGlyGlyPhePheLeuArgIleHisPro  
 AspGlyArgValAspGlyValArgGluLysSerAspProHisIleLysLeuGlnLeuGln  
 AlaGluGluArgGlyValValSerIleLysGlyValCysAlaAsnArgTyrLeuAlaMet  
 LysGluAspGlyArgLeuLeuAlaSerLysCysValThrAspGluCysPhePhePheGlu  
 ArgLeuGluSerAsnAsnTyrAsnThrTyrArgSerArgLysTyrThrSerTrpTyrVal  
 10 AlaLeuLysArgThrGlyGlnTyrLysLeuGlySerLysThrGlyProGlyGlnLysAla  
 IleLeuPheLeuProMetSerAlaLysSer

dans laquelle X représente l'un quelconque des vingt acides aminés du code génétique,

15 en amont de cette sous-séquence, une deuxième sous-séquence constituée de l'ensemble ou d'une partie tronquée dans sa partie amont et comportant plus de deux acides aminés de la suite :

20 LeuGlyAspArgGlyArgGlyArgAlaLeuProGlyGlyArgLeuGlyGlyArgGlyArg  
 GlyArgAlaProGluArgValGlyGlyArgGlyArgGlyArgGlyThrAlaAlaProArg  
 AlaAlaProAlaAlaArgGlySerArgProGlyProAlaGlyThr

et en amont de cette deuxième sous-séquence éventuellement une méthionine.

25 De préférence X est un acide aminé connu pour ne pas modifier radicalement la fonction d'une protéine lorsqu'il est substitué à la méthionine. De tels acides aminés sont en particulier la méthionine, la valine, la leucine et l'isoleucine.

30 A cause de la dégénérescence du code génétique, il existe un grand nombre de séquences d'ADN codant pour des protéines dont les séquences répondent aux formules données ci-dessus. Pour diminuer le travail de construction du gène, on choisira de préférence une séquence d'ADN ne différant de celle du gène sauvage que par quelques nucléotides. Une telle séquence, particulièrement  
 35 appréciée pour une expression du gène dans les cellules eucaryotes, est celle qui comprend une première sous-séquence :

$W_1W_2W_3$ GCAGCCGGGAGC  
 ATCACCACGCTGCCCCGCTTGCCCGAGGATGGCGGCAGCGGCCTTCCCGCCCGGCCAC  
 TTCAAGGACCCCAAGCGGCTGTACTCCAAAACGGGGGCTTCTTCTGCGCATCCACCCC  
 GACGGCCGAGTTGACGGGGTCCGGGAGAAGAGCGACCTCACATCAAGCTACAACCTCAA  
 05 GCAGAAGAGAGAGGAGTTGTGTCTATCAAAGGAGTGTGTGCTAACCGTTACCTGGCTATG  
 AAGGAAGATGGAAGATTACTGGCTTCTAAATGTGTTACGGATGAGTGTTCCTTTTGTAA  
 CGATTGGAATCTAATAACTACAATACTTACGGTCAAGGAAATACACCAAGTTGGTATGTG  
 GCACTGAAACGAACTGGGCAGTATAAACTTGGATCCAAAACAGGACCTGGGCAGAAAGCT  
 ATACTTTTCTTCCAATGTCTGCTAAGAGCTGA --

10

dans laquelle  $W_1$ ,  $W_2$ ,  $W_3$  représentent un codon susceptible d'être  
 traduit en méthionine, valine, leucine ou isoleucine, une deuxième  
 sous-séquence,

en amont de la première, constituée de l'ensemble ou d'une partie  
 15 tronquée dans sa partie amont d'un nombre entier de codons et  
 comportant plus de deux codons de la suite :

CTGGGGGACCGGGGCGCGGCGCGCTGCCGGGCGGGAGGCTGGGGGGCCGGGGCCGG  
 GGCCGTGCCCCGGAGCGGGTCGGAGGCCGGGGCCGGGGCCGGGGGACGGCGGCTCCCCGC  
 20 GCGGCTCCAGCGGCTCGGGGATCCCGGCCGGGCCCCGCAAGGACC

et en amont de cette deuxième sous-séquence éventuellement un codon ATC.

Une séquence de ce type particulièrement appréciée est  
 celle dans laquelle la deuxième sous-séquence est l'une des  
 25 sous-séquences ci-après :

GGGGACCGCGGGCGCGGCGCGCTGCCGGGCGGGAGGCTGGGGGGCCGGGGCCGG  
 GGCCGTGCCCCGGAGCGGGTCGGAGGCCGGGGCCGGGGCCGGGGGACGGCGGCTCCCCGC  
 GCGGCTCCAGCGGCTCGGGGATCCCGGCCGGGCCCCGCAAGGACC

30

et

GGGGGCCGGGGCCGG  
 GGCCGTGCCCCGGAGCGGGTCGGAGGCCGGGGCCGGGGCCGGGGGACGGCGGCTCCCCGC  
 35 GCGGCTCCAGCGGCTCGGGGATCCCGGCCGGGCCCCGCAAGGACC

Pour une expression du gène dans les microorganismes procaryotes, il est souhaitable de modifier par rapport au gène sauvage certains codons environnant le codon d'initiation ATG. Une séquence appréciée pour une expression dans *Escherichia coli* est par exemple la suivante :

```

ATGGGTGACCGTGGTCTGTGGTCGCGCGCTGCCGGGCGGGAGGCTGGGGGGCCGGGGCCGG
GGCCGTGCCCCGGAGCGGGTCGGAGGCCGGGGCCGGGGCCGGGGGACGGCGGCTCCCCGC
GCGGCTCCAGCGGCTCGGGGATCCCGGCCGGGCCCGCAGGGACCATGGCAGCCGGGAGC
10 ATCACCACGCTGCCCGCCTTGCCCGAGGATGGCGGCAGCGGCGCCTTCCCGCCGGCCAC
TTCAAGGACCCCAAGCGGCTGTACTGCAAAAACGGGGGCTTCTTCTGCGCATCCACCCC
GACGGCCGAGTTGACGGGGTCCGGGAGAAGAGCGACCCTCACATCAAGCTACAACCTCAA
GCAGAAGAGAGAGGAGTTGTGTCTATCAAAGGAGTGTGTGCTAACC GTTACCTGGCTATG
AAGGAAGATGGAAGATTACTGGCTTCTAAATGTGTTACGGATGAGTGTTCCTTTTGTAA
15 CGATTGGAATCTAATAACTACAATACTTACCGGTCAAGGAAATACACCAGTTGGTATGTG
GCACTGAAACGAACTGGGCAGTATAAACTTGGATCCAAAACAGGACCTGGGCAGAAAGCT
ATACTTTTCTTCCAATGTCTGCTAAGAGCTGA

```

L'invention concerne également un vecteur d'expression qui porte, avec les moyens nécessaires à son expression, le gène recombinant défini précédemment.

Pour une expression dans les microorganismes procaryotes, en particulier dans *Escherichia coli*, la séquence codante doit être insérée dans un vecteur d'expression comportant notamment un promoteur efficace, suivi d'un site de fixation des ribosomes en amont du gène à exprimer, ainsi qu'une séquence d'arrêt de transcription efficace en aval du gène à exprimer. Ce plasmide doit également comporter une origine de répllication et un marqueur de sélection. Toutes ces séquences doivent être choisies en fonction de la cellule hôte.

Pour une expression dans les cellules eucaryotes, notamment dans les cellules d'ovaires de hamster chinois CHO, la séquence codante est insérée dans un plasmide (par exemple dérivé du pBR 322) comportant notamment deux unités d'expression. Une première unité dans laquelle est inséré le gène d'intérêt devant un promoteur efficace (par exemple le promoteur précoce de SV40). La

séquence autour de l'ATG d'initiation est de préférence choisie en fonction de la séquence consensus décrite par KOZAK (M. KOZAK (1978) Cell., 15, 1109-1123). Une séquence intronique, par exemple l'intron de l' $\alpha$ -globine de souris, peut être insérée en amont du  
 05 gène d'intérêt ainsi qu'une séquence comportant un site de polyadénylation, par exemple une séquence de polyadénylation du SV40, en aval du gène d'intérêt. La deuxième unité d'expression comporte un marqueur de sélection (par exemple une séquence d'ADN) codant pour la dihydrofolate réductase (enzyme ci-après abrégée  
 10 DHFR). Le plasmide est transfecté dans des cellules eucaryotes, par exemple les cellules CHO DHFR<sup>-</sup> (incapables d'exprimer la DHFR). Une lignée est sélectionnée pour sa résistance au méthotrexate et exprime à un niveau suffisant le gène d'intérêt.

L'invention concerne aussi un nouveau facteur basique de  
 15 croissance des fibroblastes caractérisé en ce que sa séquence comprend une première sous-séquence :

X AlaAlaGlySer

IleThrThrLeuProAlaLeuProGluAspGlyGlySerGlyAlaPheProProGlyHis  
 20 PheLysAspProLysArgLeuTyrCysLysAsnGlyGlyPhePheLeuArgIleHisPro  
 AspGlyArgValAspGlyValArgGluLysSerAspProHisIleLysLeuGlnLeuGln  
 AlaGluGluArgGlyValValSerIleLysGlyValCysAlaAsnArgTyrLeuAlaMet  
 LysGluAspGlyArgLeuLeuAlaSerLysCysValThrAspGluCysPhePhePheGlu  
 ArgLeuGluSerAsnAsnTyrAsnThrTyrArgSerArgLysTyrThrSerTrpTyrVal  
 25 AlaLeuLysArgThrGlyGlnTyrLysLeuGlySerLysThrGlyProGlyGlnLysAla  
 IleLeuPheLeuProMetSerAlaLysSer

dans laquelle X représente l'un quelconque des vingt acides aminés du code génétique,  
 30 en amont de celle-ci une deuxième sous-séquence constituée de l'ensemble ou d'une partie tronquée dans sa partie amont et comportant plus de deux acides aminés de la suite :

LeuGlyAspArgGlyArgGlyArgAlaLeuProGlyGlyArgLeuGlyGlyArgGlyArg  
 35 GlyArgAlaProGluArgValGlyGlyArgGlyArgGlyArgGlyThrAlaAlaProArg  
 AlaAlaProAlaAlaArgGlySerArgProGlyProAlaGlyThr

et en amont de cette sous-séquence éventuellement une méthionine.

De préférence ce facteur a une séquence constituée de l'une ou l'autre des séquences ci-après :

05 GlyAspArgGlyArgGlyArgAlaLeuProGlyGlyArgLeuGlyGlyArgGlyArg  
GlyArgAlaProGluArgValGlyGlyArgGlyArgGlyArgGlyThrAlaAlaProArg  
AlaAlaProAlaAlaArgGlySerArgProGlyProAlaGlyThrMetAlaAlaGlySer  
IleThrThrLeuProAlaLeuProGluAspGlyGlySerGlyAlaPheProProGlyHis  
PheLysAspProLysArgLeuTyrCysLysAsnGlyGlyPhePheLeuArgIleHisPro  
10 AspGlyArgValAspGlyValArgGluLysSerAspProHisIleLysLeuGlnLeuGln  
AlaGluGluArgGlyValValSerIleLysGlyValCysAlaAsnArgTyrLeuAlaMet  
LysGluAspGlyArgLeuLeuAlaSerLysCysValThrAspGluCysPhePhePheGlu  
ArgLeuGluSerAsnAsnTyrAsnThrTyrArgSerArgLysTyrThrSerTrpTyrVal  
AlaLeuLysArgThrGlyGlnTyrLysLeuGlySerLysThrGlyProGlyGlnLysAla  
15 IleLeuPheLeuProMetSerAlaLysSer

et

GlyGlyArgGlyArg  
20 GlyArgAlaProGluArgValGlyGlyArgGlyArgGlyArgGlyThrAlaAlaProArg  
AlaAlaProAlaAlaArgGlySerArgProGlyProAlaGlyThrMetAlaAlaGlySer  
IleThrThrLeuProAlaLeuProGluAspGlyGlySerGlyAlaPheProProGlyHis  
PheLysAspProLysArgLeuTyrCysLysAsnGlyGlyPhePheLeuArgIleHisPro  
AspGlyArgValAspGlyValArgGluLysSerAspProHisIleLysLeuGlnLeuGln  
25 AlaGluGluArgGlyValValSerIleLysGlyValCysAlaAsnArgTyrLeuAlaMet  
LysGluAspGlyArgLeuLeuAlaSerLysCysValThrAspGluCysPhePhePheGlu  
ArgLeuGluSerAsnAsnTyrAsnThrTyrArgSerArgLysTyrThrSerTrpTyrVal  
AlaLeuLysArgThrGlyGlnTyrLysLeuGlySerLysThrGlyProGlyGlnLysAla  
IleLeuPheLeuProMetSerAlaLysSer  
30

précédée éventuellement d'une méthionine.

L'invention a également trait au médicament contenant le facteur basique de croissance des fibroblastes défini ci-dessus.

L'invention sera mieux comprise à l'aide des exemples  
35 ci-après :



EXEMPLE 1 : Caractérisation de formes de haut poids moléculaire du hbFGF

1) Isolation de L'ADNc

05 Une banque d'ADNc a été produite dans Escherichia coli MC  
1061 par insertion de L'ADNc synthétisé à partir de L'ARNm extrait  
des cellules SK-HEP1 dans le vecteur pUC 9 (Pharmacia). La  
préparation de L'ARN a été effectuée comme l'a décrit Cathala et  
al. (1). La construction des molécules d'ADN recombinant a été  
réalisée suivant la technique de L'"amorce-adaptateur" (2). Cette  
10 stratégie de clonage utilise deux oligonucléotides  
synthétiques partiellement complémentaires. Le premier appelé  
"amorce" permet la synthèse de L'ADNc. Le deuxième  
oligonucléotide appelé "adaptateur", en présence de L'ADNc simple  
brin polycytidinylé à son extrémité 3', s'apparie à L'"amorce"  
15 générant à L'extrémité 5' de L'ADNc un site de restriction  
"ouvert" (voir Fig. 1). De telles molécules d'ADNc simple brin  
peuvent être insérées directement dans un vecteur plasmidique  
digéré par deux enzymes de restriction dont L'une a été  
polyguaninylée.

20 La banque ainsi établie et comprenant  $1 \times 10^6$  clones a  
été étalée sur filtres de nitrocellulose à raison de  $2 \times 10^4$   
clones par filtre. Les filtres et des répliques de ces filtres ont  
été préparés comme le décrivent Grunstein et Hogness (3).

On a ensuite préparé en se basant sur la séquence  
25 nucléotidique du hbFGF récemment publiée (T. KUROKAWA et al.  
(1987), 213, 189-194) deux oligonucléotides synthétiques qui ont  
servi à cribler la banque. Les conditions de marquage des  
oligonucléotides ainsi que d'hybridation et de lavage des filtres  
ont été celles décrites dans "Molecular Cloning, a Laboratory  
30 manual" de Maniatis et al. (Cold Spring Harbor Laboratory, 1984).

---

(1) CATHALA et al. (1983 DNA, 2, 329-335

35 (2) CAPUT et al. (1986) PNAS USA, 83, 1670-1674

(3) GRUNDSTEIN et al. (1975) PNAS USA, 72, 3961

Les clones capables de s'hybrider simultanément avec les deux sondes synthétiques ont été recherchés. La fréquence relative de ces deux derniers était inférieure à  $2 \times 10^{-5}$ . On a ainsi pu isoler le clone pUC-SK1 contenant l'ADNc du hbFGF.

05

## 2) Détermination et analyse de la séquence de l'ADNc

L'ADN plasmidique du clone pUC-SK1 obtenu en 1) a été purifié par la méthode d'extraction alcaline. L'ADN plasmidique a été digéré par les enzymes de restriction HindIII, PstI, ECORI et BamHI par simple et double digestion. Les fragments de restriction obtenus sont analysés par électrophorèse sur gel d'agarose 1 %. Une carte d'enzymes de restriction de l'ADNc contenu dans le plasmide a été déduite (Cf. Fig.2).

L'ADN plasmidique a ensuite été digéré par différentes combinaisons des enzymes de restriction ci-dessus. Les fragments de restriction obtenus ont été fractionnés sur gel d'agarose 1 %. Certains de ceux-ci ont été extraits du gel (par la méthode "Gene clean" (CZYME)) puis sous-clonés dans le polylinker (polysite de clonage) de l'ADN du phage M13mp18 ou M13mp19 (Pharmacia). Les sous-clones M13 ainsi obtenus ont été séquencés par la méthode de Sanger. Les séquences d'ADN ainsi obtenues pour chacun des sous-clones ont été assemblées de façon à obtenir la séquence complète de l'ADNc du plasmide pUC-SK1 (Cf. Fig. 3).

Sur la base de la séquence de l'ADNc, la séquence complète d'acides aminés du hbFGF peut être déduite. La séquence de l'ADNc fait apparaître un seul site d'initiation potentiel usuel de la traduction du hbFGF : l'ATG en position 467, ci-après appelé ATG 467. La séquence d'acides aminés déduite à partir de ce codon d'initiation correspond à la séquence du hbFGF de 155 acides aminés déjà connue (T. KUROKAWA et al. (1987), 213, 189-194).

Cependant, la phase de lecture reste ouverte (pas de codon de terminaison de traduction) en amont de l'ATG bien qu'aucun autre ATG n'apparaisse en phase. Quatre sites d'initiation potentiels inusuels sont à relever : le CTG en position 302, 329 et 344 ; l'ACG en position 407, en phase avec l'ATG 467. Ces deux codons ont déjà été décrits comme initiateurs potentiels de

35

traduction (S.R. HANN et al. (1988) Cell, 52, 185-195 et A.C. PRATS (1989), J. Mol. Biol. (1989), 205, 0-10). La séquence de l'ADNc fait donc apparaître quatre formes longues potentielles de hbFGF. La plus longue comporte 210 acides aminés dont la séquence est déduite de l'ADNc, depuis le codon CTG en position 302 au codon de terminaison de traduction TGA en position 932. La séquence de l'ADNc est différente, en amont de l'ATG des deux autres séquences d'ADNc du hbFGF déjà publiées (J. ABRAHAM et al. (1986) EMBO J. (5 2523-2528 et T. KUROKAWA et al. (1987) Febs, 213, 1, 189-194). Elle comporte en effet un nucléotide supplémentaire, à la position 463 par rapport à la séquence publiée par KUROKAWA et à la position 369 par rapport à celle publiée par ABRAHAM. L'absence de l'un ou l'autre de ces nucléotides déphase ces codons d'initiation inusuels (à l'exception de l'ACG pour la séquence publiée par ABRAHAM) par rapport à l'ATG en position 467.

### 3) Transcription et traduction in vitro

Le fragment de restriction d'ADNc compris entre le site HindIII présent en amont de l'ADNc (Cf. Fig. 1) et le site ECORI en position 1711 a été purifié sur gel d'agarose 1 % par la méthode de "Gene-Clean" (OZYME). Ce fragment qui contient toute la séquence codante du hbFGF a été sous-cloné entre les sites HindIII et ECORI du polylinker du plasmide de transcription in vitro pSP64 (Promega Biotec). Le plasmide obtenu appelé pSP64hbFGF est linéarisé par l'enzyme de restriction ECORI puis transcrit en ARNhbFGF à l'aide de l'ARN polymérase SP6.

De manière similaire, différents ARN hbFGF ont été obtenus à partir de constructions où l'ADNc hbFGF sauvage a été muté ponctuellement (Cf. Fig. 4). Un premier mutant où le codon à la position 440 (codon GGA) a été changé en codon TGA (codon de terminaison), un second mutant où le codon à la position 467 (codon ATG) a été changé en codon GTC. Les deux premiers mutants ont été obtenus par la technique de mutagénèse dirigée par un oligonucléotide synthétique (4). avec utilisation de la T4 ADN polymérase

(4) (ZOLLER M.G. 1982 Nucl. Ac. Res. , 10, 6487-6500)

(Pharmacia). Un troisième et un quatrième mutant ont été obtenus où le codon CTG à la position 302 a été changé respectivement en codon TTG ou ATG. Ces deux dernières mutations ont été introduites par remplacement du fragment de restriction XhoI/NotI (position 295-319) par un oligonucléotide synthétique double brin, dans lequel la mutation à réaliser a été introduite.

Chacun des ARN hbFGF obtenus in vitro a été traduit in vitro dans un extrait de lysat de réticulocyte comme décrit ci-après. Après un traitement à la DNaseI, les ARN transcrits sont extraits deux fois avec du phénol/chloroforme, précipités avec de l'éthanol et resuspendus dans de l'eau. Les ARN, à la concentration de 10 à 20 µg/ml, ont été traduits à une température de 37°C pendant une heure par utilisation d'un système de lysat de réticulocyte de lapin (Promega Biotec) dilué deux fois en présence de 0,5 à 1 mCi/ml de méthionine (35S) (Amersham). Les protéines marquées obtenues ont été analysées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS suivie d'une autoradiographie.

L'autoradiogramme obtenu est représenté sur la figure 5.

La construction avec l'ADNc hbFGF non muté fait apparaître, après transcription et traduction in vitro, 3 bandes de protéines hbFGF de poids moléculaires approximatifs de 18, 21 et 22,5 kDa (piste 2). Le remplacement de l'ATG 467 par le codon GTG abolit la synthèse de la protéine de 18 kDa mais pas celle des protéines 21 et 22,5 kDa (piste 3). L'introduction d'un codon de terminaison TGA à la position 440 en amont de l'ATG 467 abolit les protéines de 21 kDa et 22,5 kDa mais pas celle de 18 kDa (piste 4). Ces résultats montrent que, d'une part, la protéine de 18 kDa est initiée sur l'ATG 467 et, d'autre part, que les protéines de 21 et 22,5 kDa sont initiées en amont de l'ATG probablement sur deux codons d'initiation non usuels du fait qu'il n'existe pas d'autre ATG en phase ouverte en amont de l'ATG 467.

Les codons, décrits ci-dessus en 2), CTG 302, CTG 329, CTG 344 et ACG 407 sont des codons potentiels pour initier la synthèse des protéines de 21 et 22,5 kDa. L'environnement nucléotidique d'un site d'initiation de traduction décrit par KOZAK (M. KOZAK (1978) Cell., 15 1109-1123) et la taille des protéines

obtenues in vitro suggèrent que le CTG 302 et le CTG 344 sont particulièrement de bons candidats. Le remplacement du CTG 302 par TTG réduit sévèrement la synthèse de la protéine de 22,5 kDa (piste 5). D'autre part, le remplacement de CTG 302 par ATG entraîne une augmentation importante de la synthèse de la protéine de 22,5 kDa. Ces résultats montrent que la protéine de haut poids moléculaire de 22,5 kDa du hbFGF synthétisé in vitro est initiée sur le CTG en position 302. Le CTG 344 présente le même environnement nucléotidique que le CTG 302 (GAGG/CTG/GGGG), ce qui suggère fortement que le CTG 344 initie la synthèse de la protéine de 21 kDa synthétisée in vitro.

Cette étude fait donc apparaître l'existence et la caractérisation de formes du hbFGF de plus hauts poids moléculaires que celles déjà décrites et caractérisées : une première protéine primaire de 210 acides aminés initiée sur le CTG 302 et élongée jusqu'au codon de terminaison TGA 932. Une seconde protéine primaire de 196 acides aminés initiée sur le CTG 344 et élongée jusqu'au même codon de terminaison.

**EXEMPLE 2 : Expression d'un gène recombinant hbFGF codant pour une séquence de 210 acides aminés dans les microorganismes procaryotes**

**1) Construction du vecteur d'expression**

**a) principe de fonctionnement**

Le vecteur d'origine est le vecteur pET-3a décrit par Rosenberg (Rosenberg et al. (1987) Gene, 56, 125-135) qui permet l'expression sélective de gènes clonés après transcription de leurs séquences codantes par l'ARN polymérase du phage T7. Cette ARN polymérase est produite par la souche E. coli réceptrice BL21/DE3 décrite par Studier (Studier W.F. et al. (1986) J. Mol. Biol., 189 113-130). Cette souche contient dans son génome le gène du phage T7 codant pour l'ARN polymérase, introduit à l'aide d'un phage  $\lambda$ . Le gène est sous le contrôle du promoteur la cUV5 de E. Coli permet la transcription après induction à l'IPTG (Isopropyl  $\beta$ -D-thiogalactoside). L'ARN polymérase produite transcrit fortement et spécifiquement les gènes clonés aux sites appropriés du vecteur

pET-3a, sous le contrôle d'un promoteur du phage T7. L'unité de transcription est complétée par la séquence d'un terminateur du phage T7 placée derrière le gène et qui permet la régulation de la forte transcription.

05

b) Construction du plasmide recombinant contenant le gène hbFGF codant pour une séquence de 210 acides aminés.

Tous les produits de restriction des séquences décrites ici sont soumis à une séparation sur gel d'agarose à 1 % ou 2 % (Sigma) en tampon TAE (tris acétate EDTA), simultanément avec un standard de poids moléculaires. Les fragments d'intérêt sont purifiés à partir de l'agarose par la méthode de "Gene Clean" (OZYME) selon les méthodes indiquées par le fournisseur. Les autres méthodes employées ainsi que les compositions des tampons et des réactifs utilisés sont celles décrites dans "Molecular Cloning, a laboratory manual" et celles indiquées par les fournisseurs.

La séquence codante du hbFGF est introduite dans le vecteur pET-3a, représenté sur la figure 6, aux sites de restrictions uniques NdeI et BamHI. La séquence d'un terminateur du phage fd (BUJARD (1981) PNAS, 78/8, 4936-4940) est placée en aval de la séquence hbFGF à l'aide de ces sites de restriction BamHI et HindIII. La séquence hbFGF est constituée en partie du fragment de restriction BssHII-HindIII dont les sites sont situés respectivement en position 325 et 1153 de l'ADNc. La séquence est complétée par un ADN synthétique constitué de deux oligodésoxyribonucléotides complémentaires formant des extrémités cohésives BssHII et NdeI compatibles avec la séquence d'ADNc hbFGF et celle du promoteur du phage T7. Les séquences de ces deux oligonucléotides sont les suivantes :

30

5' T ATG GGT GAC CGT GGT CGT GGT CG 3' et  
5' CGCGCGACCACGACCACGGTCACCCA 3'

(cet artifice permet de remplacer le codon initiateur naturel CTG 302 en codon initiateur ATG et de créer un environnement nucléotidique de ce dernier plus favorable pour l'expression dans

35

E. coli). Les séquences synthétiques sont chauffées à 100°C pendant une minute dans un volume réactionnel de 10 µl à une concentration de 15 µg/ml en tampon Tris-HCl pH : 7,5 10 mM/NaCl 50 mM. On laisse refroidir graduellement jusqu'à température du laboratoire de façon à hybrider les deux oligonucléotides. On conserve dans la glace.

Les quatre séquences ADN décrites ci-dessus sont assemblées in vitro dans un volume réactionnel de 30 µl et 6 unités de l'enzyme T4 ADN ligase (Pharmacia). Les séquences sont mélangées dans un rapport molaire à l'ADN vecteur, de 2 pour la séquence hbFGF et celle du terminateur du phage fd et de 100 pour la séquence synthétique. La réaction a été réalisée à une température de 15°C pendant 16 heures.

Le produit de la réaction est mis en contact avec environ 10<sup>8</sup> cellules de la souche E. coli MC 1061 décrite par Casadaban M.J. (Casadaban M.J. et al., J. of bact. 143/2-1980, 917-981), préalablement traitées au chlorure de calcium 50 mM. Les cellules transformées sont étalées sur boîtes de milieu L solide additionné de 100 µg/ml d'ampicilline. On laisse incuber 16 heures à 37°C. Douze colonies isolées sont mises en culture en milieu L additionné d'ampicilline à 100 µg/ml final jusqu'à la phase stationnaire. Les plasmides sont purifiés par la méthode de lyse alcaline décrite par Birnboim H.C. et Doly J. (Nuc. Ac. Res., 7-1979). Les plasmides sont analysés par les enzymes de restriction BssHII, NdeI, BamHI et BstEII et sélectionnés après analyse sur gel d'agarose d'après le profil théorique des fragments à obtenir.

Le clone retenu est nommé 409.2. Il contient par construction le plasmide 409.2 représenté sur la figure 7 qui comprend la séquence codante du hbFGF 210 représentée sur la figure 8 (qui précise également la séquence d'acides aminés codée).

2) Expression dans E. coli de l'ADNc du gène recombinant hbFGF codant pour une séquence de 210 acides aminés

Le plasmide 409.2 est utilisé pour transformer la souche E. coli BL21/DE3 mentionnée ci-dessus, préalablement traitée au chlorure de calcium 50 mM. Les cellules sont étalées selon la procédure décrite précédemment.

Une colonie est mise en culture en milieu L additionné de 100 µg/ml d'ampicilline. La culture est effectuée à une température de 37°C sous agitation à 180 tr/min jusqu'à une densité optique de 1 mesurée à 600 nm. On centrifuge alors en tube de 1,5 ml un volume contenant  $2.10^8$  cellules qui constitue l'échantillon témoin avant induction.

On induit l'expression de l'ADNc codant pour le hbFGF 210, en rajoutant à la culture 1 mM d'IPTG. On incube pendant 2 heures à une température de 37°C. On centrifuge un volume contenant  $2.10^8$  cellules qui constitue l'échantillon induit.

Les culots bactériens des différents échantillons sont repris dans 20 µl d'un tampon Tris-HCl pH : 6,8 ; 60 mM/SDS 2 %/Glycérol 10 %/ $\beta$ 2 mercaptoéthanol 0,5 %/bleu de bromophénol 0,05 %. On fait bouillir 10 min et on conserve dans la glace. Les échantillons sont soumis à une électrophorèse sur un gel dénaturant de polyacrylamide à 12,5 % contenant du SDS d'après les procédures décrites par Laemmli U.K. (Nature, 227, 1970, 680-685). La séparation est effectuée pendant 5 heures à 150 volts en présence d'un standard de poids moléculaire et de FGF basique témoin (la forme 146 acides aminés). Les protéines sont transférées sur membrane de nitrocellulose (Biorad) par électrotransfert en tampon Tris 20 mM/Glycine 150 mM et Méthanol 20 % pendant 3 heures avec une intensité de 200 mA et à une température de 10°C. La membrane est mise à saturer après transfert dans du tampon Al (Tris-HCl pH : 7,4/NaCl 0,9 %) et BSA 3 % (Bovine Serum Albumine) pendant 16 heures à une température de 20°C. La membrane est ensuite placée dans 30 ml de tampon Al/BSA 3 % auquel on rajoute 60 µl d'un sérum de lapin immunisé par le FGF basique purifié (forme 146 acides aminés). On incube pendant 90 min à une température de 37°C. On lave la membrane 3 fois pendant 10 min avec 150 ml de tampon Al, 3 fois pendant 10 min avec 150 ml de tampon Al/NP40 0,05 % et de nouveau 3 fois pendant 10 min avec 150 ml de tampon Al. Les complexes antigènes-anticorps sont révélés par incubation de la membrane dans 30 ml de tampon Al/BSA 3 % avec 3 µCi(111 KBq) de protéine A-I<sup>125</sup>. (Réf. NEN) pendant 1 heure à 20°C. On effectue ensuite les lavages comme décrit précédemment.



La membrane est soumise à une autoradiographie : une bande supplémentaire d'environ 22 kDa apparaît dans l'échantillon induit.

### 3) Purification du hbFGF par chromatographie d'affinité

05 Une culture de 1 litre de la souche d'E. coli BL21/DE3 transformée par le plasmide 409.2 est effectuée dans des conditions identiques à celles décrites en 2). Après induction, les cultures sont centrifugées à 5 000 g pendant 10 min et les culots de bactéries lavés avec un même volume de tampon phosphate 0,1 M  
10 pH : 6 et à nouveau centrifugés à 5 000 g pendant 10 min. Les culots sont conservés à une température de  $-20^{\circ}$ .

Le culot cellulaire est resuspendu dans 50 ml d'une solution Tris-HCl 10 mM pH : 7,4/NaCl 0,65M/0,25 % BSA/Leupeptine (peptide Institut) 1 mg par ml/Iniprol (Aprotinine) (Calbiochem)  
15 1 %/Pepstatine A (Sigma) 150  $\mu$ M/Soybean 0,1 mg par ml/EDTA 1 mM/Phénylméthylsulfonylfluoride (PMSF) 2 mM. La suspension a été soumise à une ultrasonication, puis centrifugée à 3 000 tr/min. Le surnageant a été récupéré puis incubé 1 heure à la température de  $37^{\circ}\text{C}$  en présence de DNase I à 6 mg/ml. Le surnageant a été  
20 additionné de 40 ml de la solution décrite ci-dessus, puis appliqué sur une colonne d'héparine sépharose de 10 ml préalablement tamponnée avec une solution Tris HCl 10 mM pH : 7,4/NaCl 0,65 M/EDTA 1 mM. La colonne a été lavée avec cette même solution puis avec une solution TrisHCl 10 mM pH : 7,4/NaCl 1 M/EDTA 1 mM. L'hbFGF a été  
25 éluée avec 10 ml d'une solution Tris HCl 10 mM pH : 7,4/NaCl 2 M/EDTA 0,3 mM en fractions de 1 ml.

Un échantillon de chacune des fractions d'élution a été soumis à une électrophorèse sur un gel de polyacrylamide à 14 % en présence de SDS. Les protéines du gel ont été révélées par la  
30 technique de coloration à l'argent (Biorad). Les fractions contenant une bande de 22,5 kDa ont été rassemblées. Un échantillon du pool obtenu a été analysé sur un gel de polyacrylamide (Cf. Fig. 13). La concentration d'hbFGF ainsi purifiée a été estimée à 20  $\mu$ g/ml (volume total 10 ml), par comparaison avec du bFGF de 146  
35 acides aminés déjà quantifié.

## 4) Détermination de la séquence amino terminale du hbFGF

500 µl du hbFGF purifié en 3) ont été injectés sur une colonne HPLC (2,1 x 100 mm) de phase inverse (Brownlee). Un gradient continu de 1 à 60 % d'acétonitrile, 0,1 % d'acide trifluoroacétique, a été appliqué pendant 10 min. La détection de l'éluat a été réalisée à 220 nm. Le profil d'élution présente cinq pics F<sub>1</sub>, F<sub>2</sub>, F<sub>3</sub>, F<sub>4</sub>, F<sub>5</sub> (Cf. Fig. 14). La surface du pic F<sub>2</sub> (pic majoritaire) représente plus de 70 % de la somme des surfaces des cinq pics d'élution. La fraction protéique correspondant au pic d'élution F<sub>2</sub> a été récoltée (4 à 8 µg de protéine) et séquencée à partir de l'extrémité amino terminale sur un séquenceur 470 A d'Applied Biosystems. La séquence protéique amino terminale suivante 55 acides aminés a ainsi été obtenue :

GlyAspArgGlyArgGlyArgAlaLeuProGlyGlyArgLeuGlyGlyArgGlyArg  
 GlyArgAlaProGluArgValGlyGlyArgGlyArgGlyArg X ThrAlaAlaProArg  
 AlaAlaProAlaAlaArg X X ArgProGlyProAla X X Met

(dans la séquence ci-dessus, X représente les acides aminés non déterminés).

Cette séquence est identique, comme attendu, à celle déduite du gène recombinant hbFGF codant pour une séquence de 210 acides aminés (Cf. Fig. 8), à l'exception du premier acide aminé de cette dernière, la méthionine d'initiation, absente ici à l'extrémité amino terminale. Celle-ci a donc probablement été éliminée au cours d'un processus de maturation post-traductionnel.

## 5) Détermination de l'activité mitogène du hbFGF

L'activité mitogène du hbFGF purifié en 3) a été déterminée sur des cellules endothéliades aortiques de bovin (ABAE) comme suit : les cellules ont été étalées à  $1,5 \times 10^4$  cellules par boîte de 35 mm de diamètre dans du DMEM (milieu d'Eagle modifié par Dulbecco) additionné de 10 % de sérum de veau (Seromed). Du hbFGF de 22,5 kDa a été ajouté dans le milieu tous les deux jours. L'activité mitogène a été déterminée par comptage des cellules

ABAE, à l'aide d'un compteur à cellules (Coultronic) cinq jours après l'étalement. Un témoin positif a été réalisé avec du bFGF recombinant (E. coli) de 17 kDa (146 acides aminés).

Les résultats obtenus sont représentés sur la figure 9.

05 Celle-ci montre que la forme lourde du hbFGF de 22,5 kDa produite à partir du gène recombinant exprimé dans E. coli est biologiquement active.

EXEMPLE 3 : Expression de gènes recombinants hbFGF dans les cellules eucaryotes pour démontrer la réalité biologique de l'initiation sur les codons non usuels mis en évidence dans l'exemple 1

#### 1) Construction des vecteurs d'expression

15 Le fragment de restriction de l'ADNc hbFGF entre dans le site HindIII présent en amont de l'ADNc (Cf. Fig. 1) et le site Ball (position 943) a été purifié sur gel d'agarose 1 % par la méthode "Gene Clean" (OZYME). Le site cohésif HindIII a été partiellement rempli par action de l'ADN polymérase de T4  
20 (Pharmacia) en présence de nucléotides dATP et dGTP. Ce fragment a été sous-cloné dans le polylinker de l'ADN du vecteur d'expression de l'ADN polymérase de T4 en présence de nucléotides dCTP et dTTP, et le site SmaI. La construction obtenue est appelée pSVLhbFGF ATG<sup>+</sup> (Cf. Fig. 10). Une seconde construction a été réalisée de  
25 manière identique mais avec un ADNc hbFGF muté, dans lequel le codon ATG 467 a été remplacé par le codon GTG par mutagenèse dirigée par un oligonucléotide synthétique, comme décrit dans l'exemple 1-3). La construction plasmidique obtenue est appelée pSVL hbFGF ATG<sup>-</sup>. Une troisième construction similaire au plasmide  
30 pSVL hbFGF ATG<sup>+</sup>, mais dans laquelle la partie de l'ADNc hbFGF située en amont du site ApaI (position 455) a été déléetée, a été réalisée. Elle est nommée pSVLhbFGFA.

#### 2) Transfection dans les cellules COS-3

35 Les cellules de singe COS-3 ont été cultivées dans des boîtes de 100 mm de diamètre dans le milieu d'Eagle modifié par

Dulbecco (DMEM), additionné de 10 % de sérum foetal de veau (Gibco BRL) à une température de 37°C et en présence de 5 % de gaz carbonique. 1,5 à 2 x 10<sup>6</sup> cellules COS ont été transfectées avec 20 µg d'ADN plasmidique (pSVL hbFGF ATG<sup>+</sup>, pSVL hbFGF ATG<sup>-</sup> ou pSVL hbFGFΔ) dans 5 ml de DMEM/10 % de sérum foetal de veau/200 µg/ml de Di-éthylaminoéthyl-dextran/100 µM en chloroquine. Après une incubation de 5 heures, à une température de 37°C, le mélange de transfection est enlevé. Les cellules sont rincées avec une solution de tampon phosphate (PBS) et traitées pendant une minute avec une solution de PBS à 10 % de diméthylsulfoxyde puis rincées à nouveau deux fois avec du PBS. Les cellules sont ensuite incubées pendant 65 heures dans du DMEM à 0,5 % de sérum foetal de veau.

Les cellules COS transfectées ont été décollées mécaniquement et soumises à une centrifugation. Les culots cellulaires ont été lavés deux fois avec du PBS, resuspendus à la concentration du 10<sup>7</sup> cellules/ml dans du PBS additionné de 0,2 % d'albumine de sérum bovin (BSA). Après lyse par ultrasons, les extraits ont été centrifugés à 12 000 g et les culots éliminés.

3) Analyse des extraits de cellules COS par électrophorèse et révélation à l'aide du sérum de lapin immunisé contre du bFGF (Cf. exemple 2.2)) : 25 µl des extraits de cellules COS préparées en 2) ont été fractionnés par électrophorèse sur gel de polyacrylamide 10 % en présence de SDS. Les protéines du gel sont transférées sur membrane de nitrocellulose par la technique d'électrotransfert. La membrane est incubée avec le sérum. Les complexes anticorps-antigènes sont révélés par de la protéine A radiomarquée à l'iode 125 (NEN). Une autoradiographie de la membrane a été réalisée.

L'autoradiogramme est reproduit sur la figure 11.

Pour l'extrait de cellules COS transfectées par le plasmide pSVL hbFGF ATG<sup>+</sup> (piste 3), on observe une bande dominante de 18 kDa approximativement et plusieurs bandes mineures de plus haut poids moléculaire. Ces mêmes bandes mineures sont retrouvées, avec la même intensité, pour l'extrait de cellules COS transfectées par le plasmide pSVL hbFGF ATG<sup>-</sup> (piste 4). Du fait du remplacement du codon ATG à la position 467 par un codon GTG, la bande de 18 kDa

est fortement diminuée, dans cet extrait. Seule la bande de 18 kDa (dédoublée) est présente pour l'extrait de cellules COS transfectées par le plasmide pSVL hbFGFA (piste 5).

05 L'autoradiogramme révèle d'autre part que l'extrait de cellules COS transfectées par le plasmide pSVL hbFGF ATG<sup>+</sup> renferme une quantité globale d'hbFGF beaucoup plus importante que l'extrait des cellules COS transfectées par le plasmide pSVL hbFGF ATG<sup>-</sup>.

4) Détermination de l'activité mitogène des extraits de cellules  
10 COS transfectées.

L'activité mitogène des extraits obtenus en 2) a été déterminée sur des cellules endothéliales aortiques de bovin (ABAE) comme suit : les cellules ont été étalées à  $2 \times 10^4$  cellules par boîte de 35 mm de diamètre dans du milieu DMEM additionné de 10 %  
15 de sérum de veau (Seromed). 2,5  $\mu$ M de chaque extrait COS ont été ajoutés tous les deux jours. L'activité mitogène a été déterminée par comotage de cellules ABAE cinq jours après l'étalement. Les résultats obtenus sont rassemblés dans le tableau 1 ci-après.

20 TABEAU 1 : Activité mitogène des extraits des cellules COS transfectées

25	Echantillon ajouté au milieu de cellules ABAE	Nombres de cellules par boîte après 5 Jours
	Extrait des cellules COS-3 transfectées par pSVL hbFGF ATG <sup>+</sup>	$7,3 \times 10^5$
30	Extrait des cellules COS-3 transfectées par pSVL hbFGF ATG <sup>-</sup>	$9,1 \times 10^5$
35	Extrait des cellules COS-3 transfectées par pSVL hbFGFA	$8,7 \times 10^5$

	Extrait des cellules COS-3 transfectées par pSVL (témoin négatif)	$2,5 \times 10^5$
05	1 ng de bFGF recombinant de 17 kDa (146 acides aminés) produit dans <i>Escherichia coli</i> (témoin positif)	$8,7 \times 10^5$
10	Pas d'adjonction	$1,2 \times 10^5$

Le tableau 1 montre que l'extrait de cellules transfectées par pSVL hbFGF ATG<sup>-</sup> est capable de stimuler la division cellulaire des cellules endothéliales ABAB. L'ATG à la position 467 n'est donc pas indispensable à la synthèse de hbFGF biologiquement actif. Ce résultat, dans les cellules eucaryotes, corrobore ceux développés dans l'exemple 1, dans lequel il est démontré in vitro l'existence de codons initiateurs de traduction non usuels en amont de l'ATG 467.

D'autre part, il apparaît que l'activité mise en évidence dans l'extrait de cellules COS transfectées par le plasmide pSVL hbFGF ATG<sup>-</sup> est voisine, voire meilleure, que celle décelée dans l'extrait de cellules COS transfectées par le plasmide pSVL hbFGF ATG<sup>+</sup>. Or le premier extrait contient une quantité globale d'hbFGF très inférieure à celle du deuxième extrait (Cf. 3) ci-dessus). Ces résultats montrent une activité mitogène des formes de hbFGF de haut poids moléculaire mises en évidence par les bandes mineures de l'autoradiogramme présenté en 3) ci-dessus.

##### 5) Capacité des extraits à stimuler la synthèse d'ADN dans les cellules BALB/C 3T3.

Les cellules BALB/C 3T3 ont été cultivées dans des plaques de microtitration de 96 puits dans du milieu DMEM additionné de 10 % de sérum foetal de veau. Après 7 jours de

culture, le milieu de culture des cellules BALB/C 3T3 en phase stationnaire a été additionné de thymidine tritiée ( $H_3$ ) (Amersham) et de volumes variables d'extraits de cellules COS préparées en 2). Après 48 heures d'incubation, les cellules BALB/C 3T3 ont été collectées par action de la trypsine et la quantité de thymidine ( $H_3$ ) incorporée a été mesurée.

Les résultats obtenus sont répertoriés dans la figure 12. Il apparaît que l'extrait de cellules COS transfectées par le plasmide pSVL hbFGF ATG<sup>-</sup> est capable de stimuler la synthèse d'ADN des cellules BALB/C 3T3, résultat qui corrobore ceux développés en 4) ci-dessus où il est établi que cet extrait est capable de stimuler la division cellulaire des cellules endothéliales ABAB.

Cette étude (exemple 3) a été réalisée en maintenant les codons d'initiation non usuels peu efficaces, notamment les CTG 302 et CTG 344, afin de mettre en évidence la réalité biologique de l'initiation de la traduction sur ces codons, déjà démontrée in vitro dans l'exemple 1. Il est évident pour l'homme du métier que dans un but de surproduction d'une forme lourde du hbFGF le codon d'initiation usuel ATG (plus efficace) sera utilisé dans le gène recombinant, comme cela a été fait pour produire la forme de 209 acides aminés dans Escherichia coli (Cf. exemple 2 ci-dessus).

REVENDEICATIONS

1. Gène recombinant comportant une séquence d'ADN codant pour un facteur basique de croissance des fibroblastes, caractérisé en ce que celle-ci code pour une protéine dont la séquence comprend une première sous-séquence :

X AlaAlaGlySer

IleThrThrLeuProAlaLeuProGluAspGlyGlySerGlyAlaPheProProGlyHis  
 10 PheLysAspProLysArgLeuTyrCysLysAsnGlyGlyPhePheLeuArgIleHisPro  
 AspGlyArgValAspGlyValArgGluLysSerAspProHisIleLysLeuGlnLeuGln  
 AlaGluGluArgGlyValValSerIleLysGlyValCysAlaAsnArgTyrLeuAlaMet  
 LysGluAspGlyArgLeuLeuAlaSerLysCysValThrAspGluCysPhePhePheGlu  
 ArgLeuGluSerAsnAsnTyrAsnThrTyrArgSerArgLysTyrThrSerTrpTyrVal  
 15 AlaLeuLysArgThrGlyGlnTyrLysLeuGlySerLysThrGlyProGlyGlnLysAla  
 IleLeuPheLeuProMetSerAlaLysSer

- dans laquelle X représente l'un quelconque des vingt acides aminés du code génétique,
- 20 en amont de cette sous-séquence une deuxième sous-séquence constituée de l'ensemble ou d'une partie tronquée dans sa partie amont et comportant plus de deux acides aminés de la suite :

LeuGlyAspArgGlyArgGlyArgAlaLeuProGlyGlyArgLeuGlyGlyArgGlyArg  
 25 GlyArgAlaProGluArgValGlyGlyArgGlyArgGlyArgGlyThrAlaAlaProArg  
 AlaAlaProAlaAlaArgGlySerArgProGlyProAlaGlyThr

- et en amont de cette deuxième sous-séquence éventuellement une méthionine.

- 30 2. Gène selon la revendication 1, caractérisé en ce que X est choisi parmi la méthionine, la valine, la leucine et l'isoleucine.

3. Gène selon la revendication 2, caractérisé en ce que sa séquence d'ADN code pour une protéine dont la séquence est constituée de la séquence ci-après :
- 35



GlyAspArgGlyArgGlyArgAlaLeuProGlyGlyArgLeuGlyGlyArgGlyArg  
 GlyArgAlaProGluArgValGlyGlyArgGlyArgGlyArgGlyThrAlaAlaProArg  
 AlaAlaProAlaAlaArgGlySerArgProGlyProAlaGlyThrMetAlaAlaGlySer  
 IleThrThrLeuProAlaLeuProGluAspGlyGlySerGlyAlaPheProProGlyHis  
 05 PheLysAspProLysArgLeuTyrCysLysAsnGlyGlyPhePheLeuArgIleHisPro  
 AspGlyArgValAspGlyValArgGluLysSerAspProHisIleLysLeuGlnLeuGln  
 AlaGluGluArgGlyValValSerIleLysGlyValCysAlaAsnArgTyrLeuAlaMet  
 LysGluAspGlyArgLeuLeuAlaSerLysCysValThrAspGluCysPhePhePheGlu  
 ArgLeuGluSerAsnAsnTyrAsnThrTyrArgSerArgLysTyrThrSerTrpTyrVal  
 10 AlaLeuLysArgThrGlyGlnTyrLysLeuGlySerLysThrGlyProGlyGlnLysAla  
 IleLeuPheLeuProMetSerAlaLysSer,

précédée éventuellement d'une méthionine.

4. Gène selon la revendication 2, caractérisé en ce que sa  
 15 séquence d'ADN code pour une protéine dont la séquence est  
 constituée de la séquence ci-après :

GlyGlyArgGlyArg  
 GlyArgAlaProGluArgValGlyGlyArgGlyArgGlyArgGlyThrAlaAlaProArg  
 20 AlaAlaProAlaAlaArgGlySerArgProGlyProAlaGlyThrMetAlaAlaGlySer  
 IleThrThrLeuProAlaLeuProGluAspGlyGlySerGlyAlaPheProProGlyHis  
 PheLysAspProLysArgLeuTyrCysLysAsnGlyGlyPhePheLeuArgIleHisPro  
 AspGlyArgValAspGlyValArgGluLysSerAspProHisIleLysLeuGlnLeuGln  
 AlaGluGluArgGlyValValSerIleLysGlyValCysAlaAsnArgTyrLeuAlaMet  
 25 LysGluAspGlyArgLeuLeuAlaSerLysCysValThrAspGluCysPhePhePheGlu  
 ArgLeuGluSerAsnAsnTyrAsnThrTyrArgSerArgLysTyrThrSerTrpTyrVal  
 AlaLeuLysArgThrGlyGlnTyrLysLeuGlySerLysThrGlyProGlyGlnLysAla  
 IleLeuPheLeuProMetSerAlaLysSer,

30 précédée éventuellement d'une méthionine.

5. Gène selon la revendication 2, caractérisé en ce que sa  
 séquence d'ADN comprend une première sous-séquence :

W<sub>1</sub> W<sub>2</sub> W<sub>3</sub> GCAGCCGGGAGC  
 35 ATCACACGCTGCCCGCCTTGCCCGAGGATGGCGGCAGCGGCCTTCCCGCCCGGCCAC  
 TTCAAGGACCCCAAGCGGCTGTACTGCAAAAACGGGGGCTTCTTCCTGCGCATCCACCC

05 GACGGCCGAGTTGACGGGCTCCGGGAGAAGAGCGACCTCACATCAAGCTACAACCTCAA  
 GCAGAAGAGAGAGGAGTTGTGTCTATCAAAGGAGTGTGTGCTAACCGTTACCTGGCTATG  
 AAGGAAGATGGAAGATTACTGGCTTCTAAATGTGTTACGGATGAGTGTCTTTTTTGAA  
 CGATTGGAATCTAATACTACAATACTTACCGGTCAAGGAAATACACCAGTTGGTATGTG  
 GCACTGAAACGAACTGGGCAGTATAAACTTGGATCCAAAACAGGACCTGGGCAGAAAGCT  
 ATACTTTTCTTCCAATGTCTGCTAAGAGCTGA

dans laquelle  $W_1$ ,  $W_2$ ,  $W_3$  représentent un codon susceptible d'être  
 traduit en méthionine, valine, leucine ou isoleucine,

10 en amont de cette sous-séquence une deuxième sous-séquence consti-  
 tuée de l'ensemble ou d'une partie tronquée dans sa partie amont  
 d'un nombre entier de codons et comportant plus de deux codons de  
 la suite :

15 CTGGGGGACCGCGGGCGCGGCCGCGCTGCCGGGCGGGAGGCTGGGGGGCCGGGGCCGG  
 GGCCGTGCCCCGGAGCGGGTCGGAGGCCGGGGCCGGGGCCGGGGGACGGCGGCTCCCCGC  
 GCGGCTCCAGCGGCTCGGGGATCCCGGCCGGGCCCGCAGGGACC

et en amont de cette deuxième sous-séquence un codon ATG.

20 6. Gène selon la revendication 5 caractérisé en ce que la  
 deuxième sous-séquence est l'une des sous-séquences ci-après :

25 GGGGACCGCGGGCGCGGCCGCGCTGCCGGGCGGGAGGCTGGGGGGCCGGGGCCGG  
 GGCCGTGCCCCGGAGCGGGTCGGAGGCCGGGGCCGGGGCCGGGGGACGGCGGCTCCCCGC  
 GCGGCTCCAGCGGCTCGGGGATCCCGGCCGGGCCCGCAGGGACC

et

GGGGGCCGGGGCCGG  
 GGCCGTGCCCCGGAGCGGGTCGGAGGCCGGGGCCGGGGCCGGGGGACGGCGGCTCCCCGC  
 GCGGCTCCAGCGGCTCGGGGATCCCGGCCGGGCCCGCAGGGACC

30

7. Gène selon la revendication 3, caractérisé en ce que sa  
 séquence d'ADN est la suivante :

35 ATGGGTGACCGTGGTCTGTTGCGCGCTGCCGGGCGGGAGGCTGGGGGGCCGGGGCCGG  
 GGCCGTGCCCCGGAGCGGGTCGGAGGCCGGGGCCGGGGCCGGGGGACGGCGGCTCCCCGC  
 GCGGCTCCAGCGGCTCGGGGATCCCGGCCGGGCCCGCAGGGACCATGGCAGCCGGGAGC

ATCACCCAGCTGCCCGCCTTGCCCGAGGATGCGGCGAGCGGCGCCTTCCCGCCCGGCCAC  
 TTCAAGGACCCCAAGCGGCTGTA CTGCAAAAACGGGGGCTTCTTCTGCGCATCCACCCC  
 GACGSCCGAGTTGACGGGGTCCGGGAGAAGAGCGACCCTCACATCAAGCTACAAC TTCAA  
 GCAGAAGAGAGAGGAGTTGTGTCTATCAAAGGAGTGTGTGCTAACCGTTACCTGGCTATG  
 05 AAGGAAGATGGAAGATTACTGGCTTCTAAATGTGTTACGGATGAGTGTCTTTTGTGAA  
 CGATTGGAATCTAATAACTACAATACTTACCGGTCAAGGAAATACACCAGTTGGTATGTG  
 GCACTGAAACGAAC TGGGAGTATAAACTTGGATCCAAAACAGGACCTGGGCAGAAAGCT  
 ATACTTTTCTTCCAATGTCTGCTAAGAGCTGA

- 10 8. Vecteur d'expression, caractérisé en ce qu'il porte, avec les moyens nécessaires à son expression, une séquence selon l'une des revendications 1 à 7.
9. Cellules eucaryotes, caractérisées en ce qu'elles sont transfectées par un vecteur d'expression selon la revendication 8.
- 15 10. Microorganismes procaryotes, caractérisés en ce qu'ils contiennent un vecteur d'expression selon la revendication 8.
11. Microorganismes procaryotes selon la revendication 10, caractérisés en ce qu'ils appartiennent à l'espèce *Escherichia coli*.
- 20 12. Facteur basique de croissance des fibroblastes, caractérisé en ce que sa séquence comprend une première sous-séquence :

X AlaAlaGlySer

IleThrThrLeuProAlaLeuProGluAspGlyGlySerGlyAlaPheProProGlyHis  
 25 PheLysAspProLysArgLeuTyrCysLysAsnGlyGlyPhePheLeuArgIleHisPro  
 AspGlyArgValAspGlyValArgGluLysSerAspProHisIleLysLeuGlnLeuGln  
 AlaGluGluArgGlyValValSerIleLysGlyValCysAlaAsnArgTyrLeuAlaMet  
 LysGluAspGlyArgLeuLeuAlaSerLysCysValThrAspGluCysPhePhePheGlu  
 ArgLeuGluSerAsnAsnTyrAsnThrTyrArgSerArgLysTyrThrSerTrpTyrVal  
 30 AlaLeuLysArgThrGlyGlnTyrLysLeuGlySerLysThrGlyProGlyGlnLysAla  
 IleLeuPheLeuProMetSerAlaLysSer

dans laquelle X représente l'un quelconque des vingt acides aminés du code génétique,

en amont de cette sous-séquence une seconde sous-séquence constituée de l'ensemble ou d'une partie tronquée dans sa partie amont et comportant plus de deux acides aminés de la suite :

05      LeuGlyAspArgGlyArgGlyArgAlaLeuProGlyGlyArgLeuGlyGlyArgGlyArg  
GlyArgAlaProGluArgValGlyGlyArgGlyArgGlyArgGlyThrAlaAlaProArg  
AlaAlaProAlaAlaArgGlySerArgProGlyProAlaGlyThr

et en amont de cette sous-séquence éventuellement une méthionine.

10      13.      Facteur selon la revendication 12, caractérisé en ce que sa séquence est constituée de la séquence suivante :

15                      GlyAspArgGlyArgGlyArgAlaLeuProGlyGlyArgLeuGlyGlyArgGlyArg  
GlyArgAlaProGluArgValGlyGlyArgGlyArgGlyArgGlyThrAlaAlaProArg  
AlaAlaProAlaAlaArgGlySerArgProGlyProAlaGlyThrMetAlaAlaGlySer  
IleThrThrLeuProAlaLeuProGluAspGlyGlySerGlyAlaPheProProGlyHis  
PheLysAspProLysArgLeuTyrCysLysAsnGlyGlyPhePheLeuArgIleHisPro  
AspGlyArgValAspGlyValArgGluLysSerAspProHisIleLysLeuGlnLeuGln  
AlaGluGluArgGlyValValSerIleLysGlyValCysAlaAsnArgTyrLeuAlaMet  
20      LysGluAspGlyArgLeuLeuAlaSerLysCysValThrAspGluCysPhePhePheGlu  
ArgLeuGluSerAsnAsnTyrAsnThrTyrArgSerArgLysTyrThrSerTrpTyrVal  
AlaLeuLysArgThrGlyGlnTyrLysLeuGlySerLysThrGlyProGlyGlnLysAla  
IleLeuPheLeuProMetSerAlaLysSer,

25      précédée éventuellement d'une méthionine.

14.      Facteur selon la revendication 12, caractérisé en ce que sa séquence est constituée de la séquence suivante :

30                      GlyGlyArgGlyArg  
GlyArgAlaProGluArgValGlyGlyArgGlyArgGlyArgGlyThrAlaAlaProArg  
AlaAlaProAlaAlaArgGlySerArgProGlyProAlaGlyThrMetAlaAlaGlySer  
IleThrThrLeuProAlaLeuProGluAspGlyGlySerGlyAlaPheProProGlyHis  
PheLysAspProLysArgLeuTyrCysLysAsnGlyGlyPhePheLeuArgIleHisPro  
AspGlyArgValAspGlyValArgGluLysSerAspProHisIleLysLeuGlnLeuGln  
AlaGluGluArgGlyValValSerIleLysGlyValCysAlaAsnArgTyrLeuAlaMet  
35      LysGluAspGlyArgLeuLeuAlaSerLysCysValThrAspGluCysPhePhePheGlu

ArgLeuGluSerAsnAsnTyrAsnThrTyrArgSerArgLysTyrThrSerTrpTyrVal  
AlaLeuLysArgThrGlyGlnTyrLysLeuGlySerLysThrGlyProGlyGlnLysAla  
IleLeuPheLeuProMetSerAlaLysSer

05 précédée éventuellement d'une méthionine.

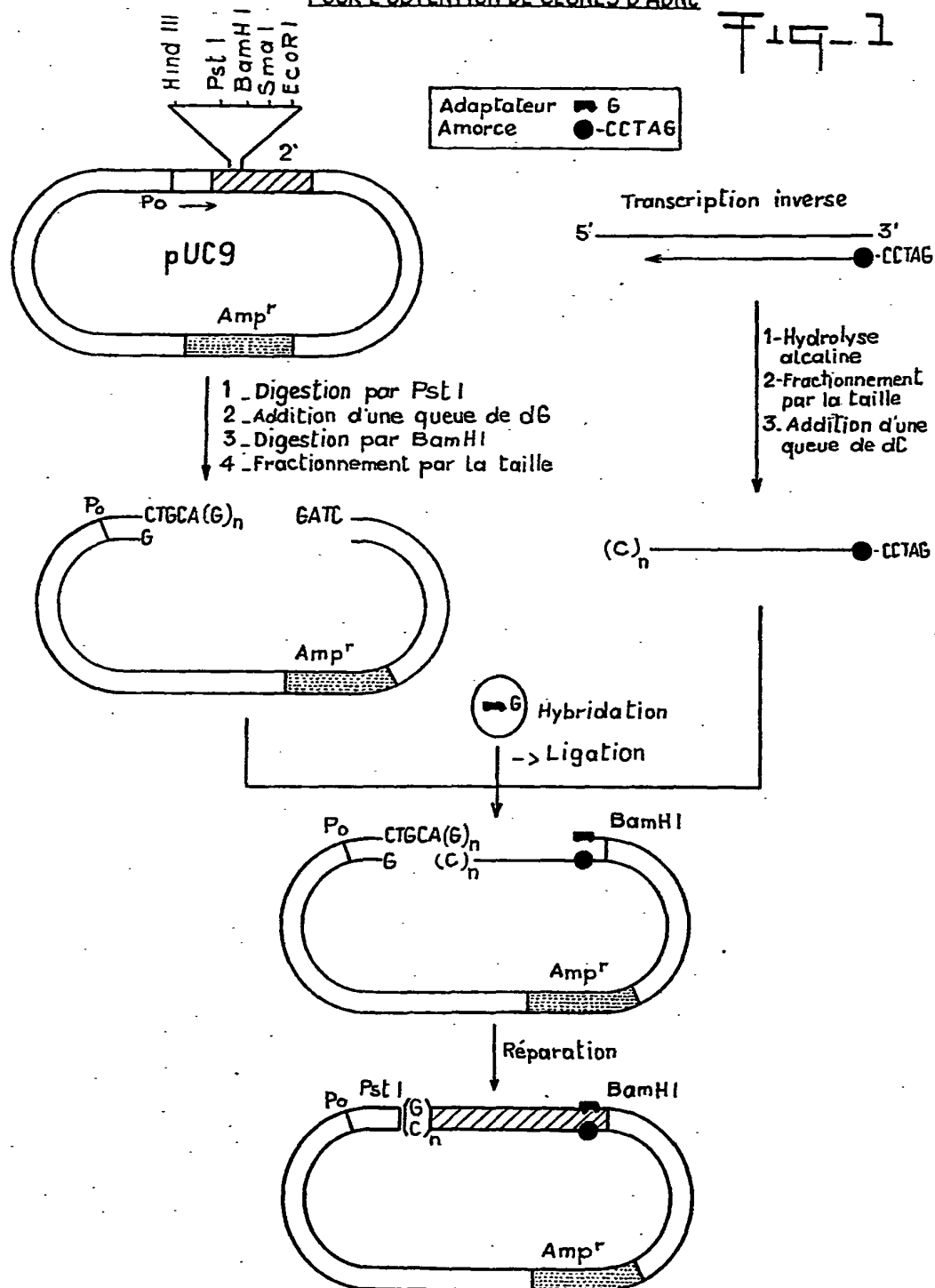
15. Médicament, caractérisé en ce qu'il contient un facteur  
basique de croissance selon l'une des revendications 12 à 14.

1/14

## TECHNIQUE DE L' "AMORCE-ADAPTATEUR"

POUR L'OBTENTION DE CLONES D'ADNC

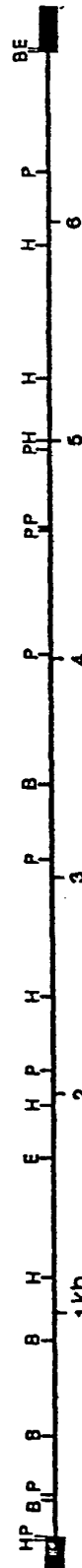
Fig-1



2/14

F19-2

CARTE D'ENZYMES DE RESTRICTION DE L'ADNC bb1GF  
DU PLASMIDE pUC-SK1



- B = BamH I
- P = Pst I
- H = Hind III
- E = EcoR I

F-19-3

Les sites potentiels de polyadénylation sont soulignés.  
Les codons fléchés sont trois codons potentiels  
d'initiation de la traduction.

SEQUENCE DE L'ADNC HBTG DU PLASHIDE PUC-SK1  
ET SEQUENCE PROTEIQUE DEDUITE

*(The following text is a highly distorted and nonsensical representation of the original document's content, appearing as a series of random characters and symbols.)*



F-19-4

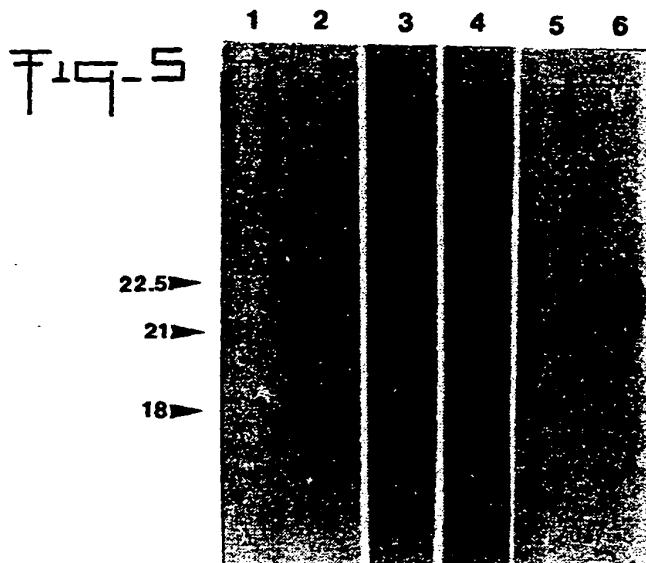
290 ATG TTG 380  
 AGCGGCTCGAGGGTGGGGG-CCGGCGAGCGGGCGGGCGGTGTCGGGGCGGAGGGCTGGGGGGCCGGGGCCGGGGCCGTGCCCCGAGCGGGTTCGGAGGC  
LeuGlyAspArgGlyArgGlyArgAlaLeuProGlyGlyArgLeuGlyGlyArgGlyArgGlyArgAlaProGluArgValGlyGly  
 389 TGA GTC 480  
 CCGGGCGGGGCGGGGGGACGGCGGGTCCCGCGGGGTCACAGCGGCTCGGGGATCCCGCCGGGGCCCGCAGGAGACCATGGCAGCGGGGAGCATCACC  
ArgGlyArgGlyArgGlyThrAlaAlaProArgAlaAlaProAlaAlaArgGlySerArgProGlyProAlaGlyThrMetAlaAlaGlySerIleThr

les acides aminés soulignés positionnent trois sites potentiels d'initiation de traduction.

2642086

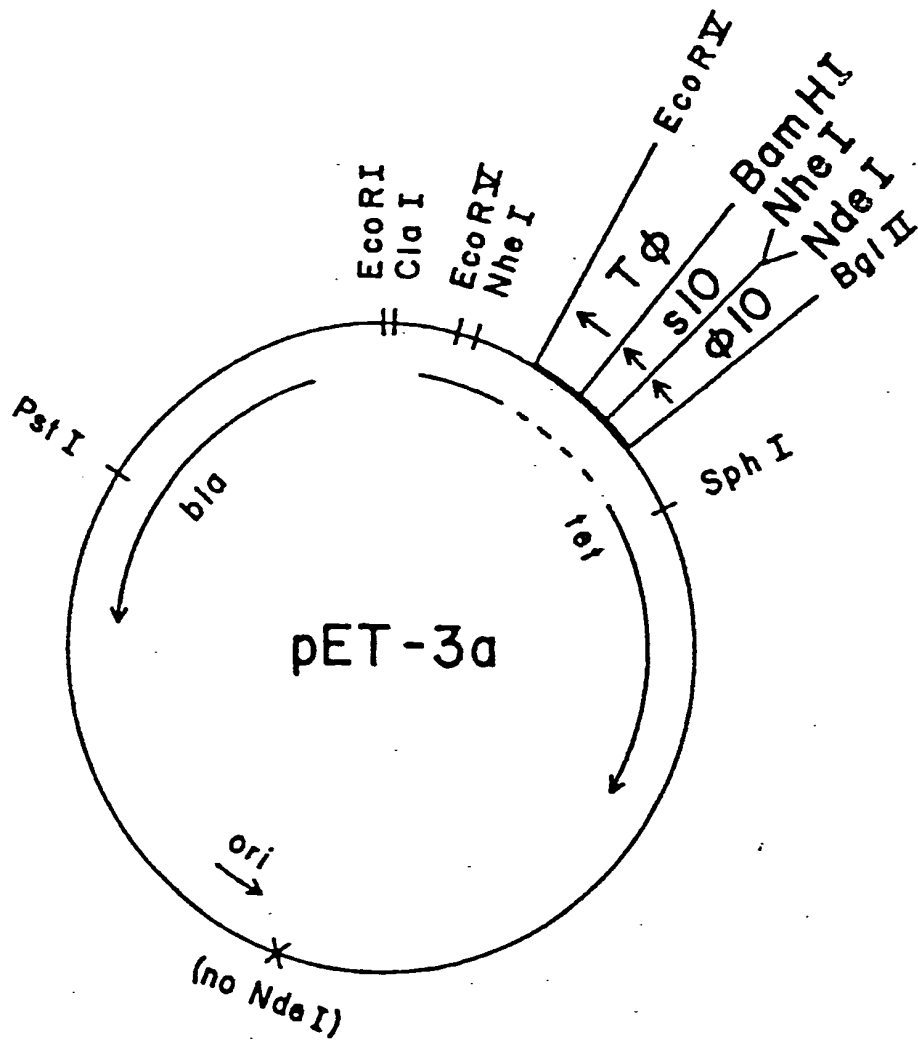
5/14

TRADUCTION IN VITRO D'ARN hbFGF OBTENUS  
PAR TRANSCRIPTION IN VITRO D'ADNc hbFGF



- 1 - témoin négatif
- 2 - ADNc hbFGF sans mutation
- 3 - ADNc hbFGF avec codon ATG 467 muté en GTG
- 4 - " " " GGA 440 " TGA (codon stop)
- 5 - " " " CTG 302 " TTG
- 6 - " " " CTG 302 " ATG

6 / 14

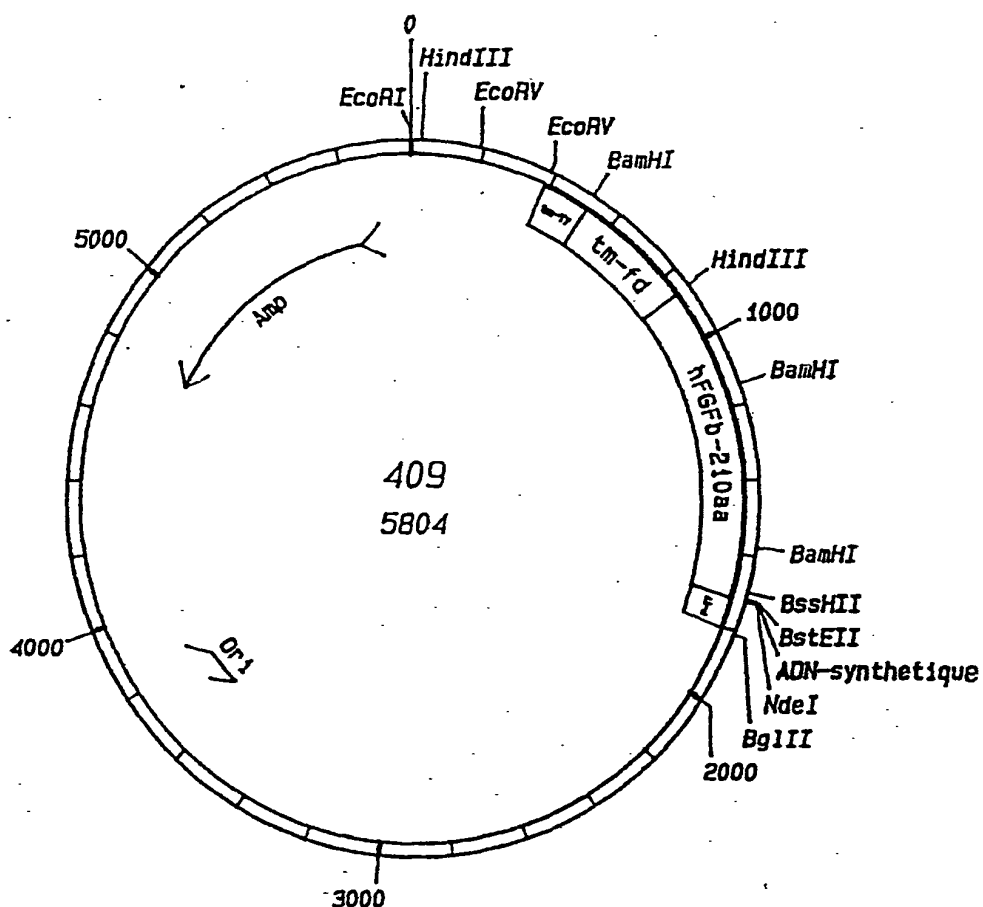


T-1-6

7/14

## 7/14

7-19-7



Promoteur phi-10 du phage T7: positions 1808-1721  
Sequence hbF6F-210sa: positions 1720- 857  
Terminateur du phage fd: positions 856- 516  
Terminateur phi-10 du phage T7: positions 515- 383

8/14

SEQUENCE CODANTE DU hbFGF DE 210 ACIDES AMINESDU PLASMIDE 409-2

T19-10

A\*GGG\*GACCGTGGT\*CGTGGT\*CGCGCGCTG CCGGGCGGGAGGCTGGGGGGCCGGGGCCGG  
 MetGlyAspArgGlyArgGlyArgAlaLeu ProGlyGlyArgLeuGlyGlyArgGlyArg  
 GGCCGTGCCCCGGAGCGGGTCGGAGGCGCG GGCCGGGGCCGGGGAGCGGCGCTCCCCGC  
 GlyArgAlaProGluArgValGlyGlyArg GlyArgGlyArgGlyThrAlaAlaProArg  
 GCGGCTCCAGCGGCTCGGGGATCCCGGCCG GGCCCCGCGGGGACCATGGCAGCCGGGAGC  
 AlaAlaProAlaAlaArgGlySerArgPro GlyProAlaGlyThrMetAlaAlaGlySer  
 ATCACCACGCTGCCCGCCTTGCCCGAGGAT GGCGGCAGCGGCGCCTTCCCGCCCGGCCAC  
 IleThrThrLeuProAlaLeuProGluAsp GlyGlySerGlyAlaPheProProGlyHis  
 TTCAAGGACCCCAAGCGGCTGTACTGCAAA AACGGGGGCTTCTTCTGCGCATCCACCCC  
 PheLysAspProLysArgLeuTyrCysLys AsnGlyGlyPhePheLeuArgIleHisPro  
 GACGGCCGAGTTGACGGGGTCCGGGAGAAG AGCGACCCTCACATCAGCTACAACTTCAA  
 AspGlyArgValAspGlyValArgGluLys SerAspProHisIleLysLeuGlnLeuGln  
 GCAGAAGAGAGAGAGATTGTGCTATCAAA GGAGTGTGTCTAACCGTTACCTGGCTATG  
 AlaGluGluArgGlyValValSerIleLys GlyValCysAlaAsnArgTyrLeuAlaMet  
 AAGGAAGATGGAAGATTACTGGCTTCTAAA TGTGTTACGGATGAGTGTCTTTTGTGAA  
 LysGluAspGlyArgLeuLeuAlaSerLys CysValThrAspGluCysPhePheGlu  
 CGATTGGAACTAATAACTACAATACTTAC CGGTCAAGGAATACACCAGTTGGTATGTG  
 ArgLeuGluSerAsnAsnTyrAsnThrTyr ArgSerArgLysTyrThrSerTrpTyrVal  
 GCACTGAACGAACCTGGGCAGTATAAAGTT GGATCCAAACAGGACCTGGGCAGAAAGCT  
 AlaLeuLysArgThrGlyGlnTyrLysLeu GlySerLysThrGlyProGlyGlnLysAla  
 ATACTTTTCTTCCAATGTCTGTAAGAGC TGA  
 IleLeuPheLeuProMetSerAlaLysSer End

Les points indiquent les nucleotides modifiés par rapport à la  
 sequence sauvage

2642086

9 / 14

# ACTIVITÉ MITOGÈNE DU hbFGF 22,5 kD

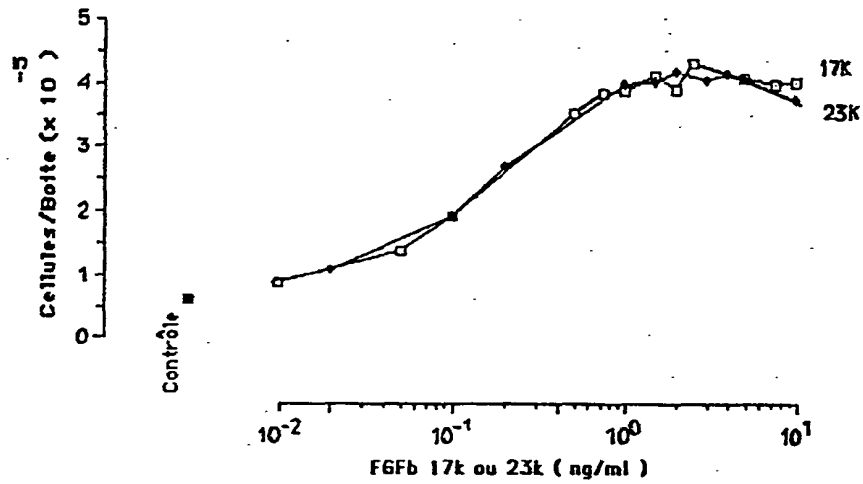


Fig 9

10 / 14

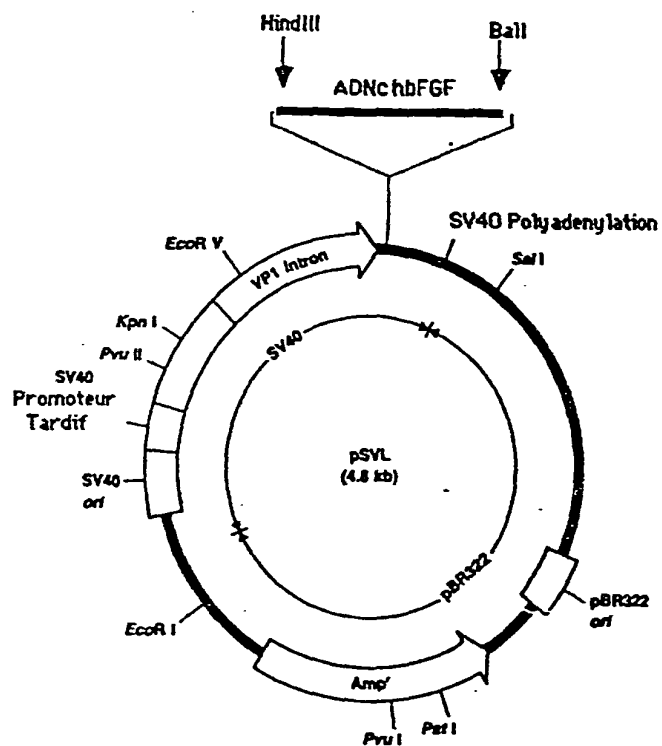
CARTE DU PLASMIDE D'EXPRESSION pSVL hbFGF ATG<sup>+</sup>

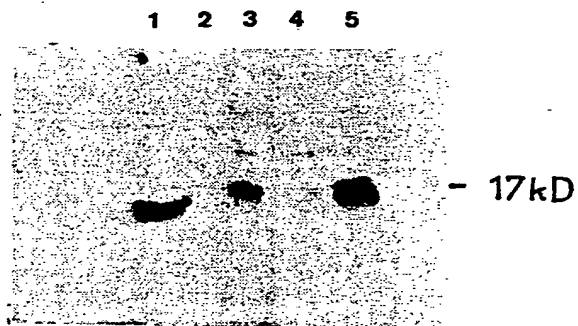
Fig. 10

2642086

11/14

ANALYSE DES EXTRAITS DE CELLULES COS-3  
PAR IMMUNO-TRANSFERT

Fig. 11



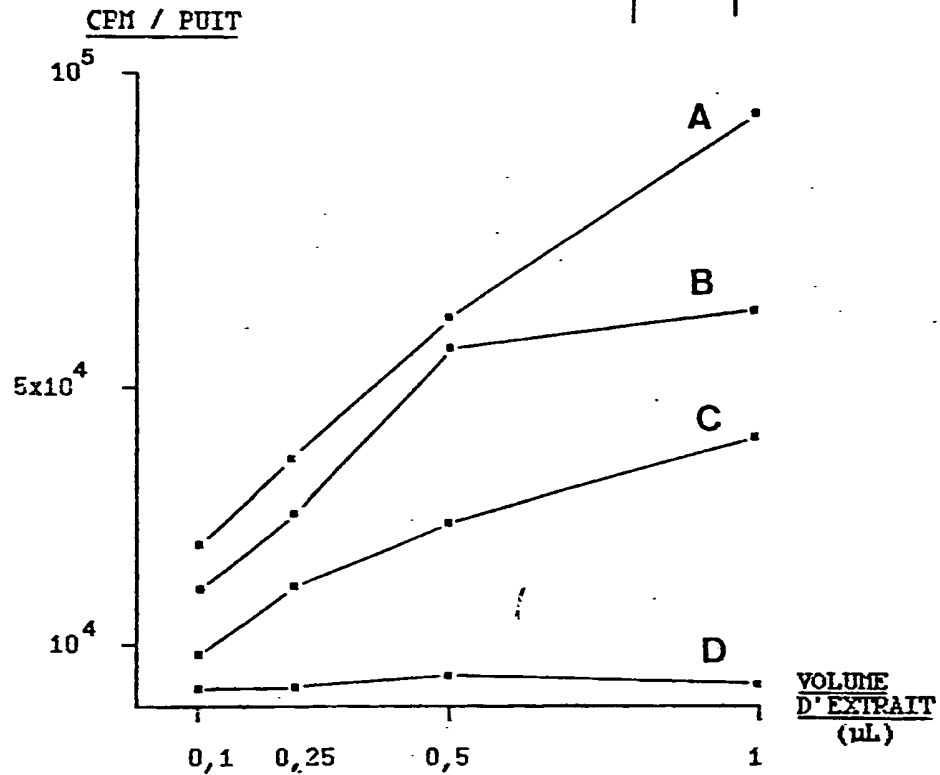
- 1 - bFGF recombinant de 17kD produit dans E.Coli
- 2 - Extrait cellules COS transfectées par pSVL
- 3 - " " " " pSVL hbFGF ATG<sup>+</sup>
- 4 - " " " " pSVL hbFGF ATG<sup>-</sup>
- 5 - " " " " pSVL hbFGF Δ



12 / 14

CAPACITE DES EXTRAITS DE CELLULES COS A INDUIRE  
LA SYNTHÈSE D'ADN DANS LES CELLULES BALB/C 3T3

Fig-12



- A - Extrait cellules COS transfectées par pSVL hbFGF Δ  
 B - " " " " pSVL hbFGF ATG<sup>+</sup>  
 C - " " " " pSVL hbFGF ATG<sup>-</sup>  
 D - " " " " pSVL

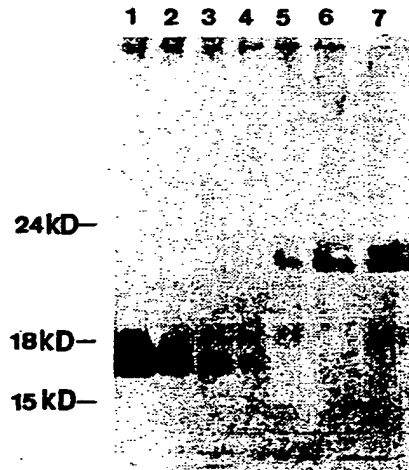
2642086

13 / 14

ANALYSE DU hbFGF 22,5kD PURIFIE PAR HEPARINE SEPHAROSE:

1,2,3 et 4 - 500ng, 100ng, 50ng et 15ng de bFGF 17kD (gamme témoin)  
5,6 et 7- 1 $\mu$ l, 5 $\mu$ l et 10 $\mu$ l de hbFGF 22,5kD

T19-13



2642086

14/14

PURIFICATION DU hbFGF 22,5KD PAR CHROMATOGRAPHIE D'AFFINITÉ

HPLC EN PHASE INVERSE

Fig-14

